

**Adatok az *Azotobacter vinelandii*
tenyészetből nyert sejtnélküli szubsztrátum
nitrogénkötő aktivitásához**

T. K. ILJINA

Dokucsajev Talajtani Intézet, Moszkva (Szovjetunió)

A biológiai nitrogénkötés szubmikroszkopikus szinten történő tanulmányozása aránylag rövid múltra tekinthet vissza. Az első szétroncsolt sejtekből álló rendszert, amely képes volt megkötni a molekuláris nitrogént, CARNAHAMnak és munkatársainak [2] valamint NICHOLASnak és FISCHERnek [6] 1860-ban sikerült előállítani. Azóta ez a kutatási irány jelentősen kiszélesedett, mivel segítségével újabb adatokat nyerhetünk a légköri nitrogén megkötése mechanizmusának felderítése terén.

Kísérleti rész

Vizsgálataink során fő feladatunkat az képezte, hogy megállapítsuk azokat az optimális körülményeket, amelyek jelenlétében a legnagyobb intenzitással megy végbe a nitrogén megkötése. A tesztorganizmusként alkalmazott *Azotobacter vinelandii* kultúrákat a Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszéke bocsájtotta rendelkezésünkre. Az *Azotobacter vinelandii* tenyésztésére négy különböző tápközeget használtunk fel. Az I. táptalaj a FJODOROV [5] által módosított azotobacter medium volt, a II. szubsztrátum ettől annyiban tért el, hogy glukóz helyett szaharóz szolgált szénforrásként. A III. és IV. táptalajokat NICHOLAS [7] munkájából vettük.

A 4 különböző tápoldatban részben álló kultúrákban, részben pedig rázatott tenyészetekben állítottuk be a kísérleteket. A sejtek szaporodását nefelometrikus úton határoztuk meg, míg a megkötött nitrogén mennyiségét a logaritmikus növekedési fázis végén Kjeldahl roncsolásos módszerével mutattuk ki. A táblázat adataiból látható, hogy a sejtszaporodás legnagyobb intenzitással a III. tápoldatban ment végbe. Valószínű, hogy a tápoldatba vitt szerves sav pozitívan befolyásolta a szaporodást. Megállapítást nyert, hogy a rázatott kultúráknál a szénforrás nem bomlott le teljesen CO_2 -ig és vízig, hanem jelentős mennyiségű szerves sav felhalmozódását észleltük. 100 ml tápoldatban 0,6 milliegyenérték sav mutatható ki. A tápoldat elsavanyodása gátolta a további növekedést, s igen intenzív nyálkaképzést váltott ki a tenyészetnél. Minőségi reakciók segítségével jelentős mennyiségű piroszölősavat és ketoglutársavat sikerült kimutatnunk, ami a szén anyagcsere felborulására hívja fel a figyelmet. A fentiek arra mutatnak, hogy az intenzív levegőellátás gátolja az *Azotobacter vinelandii* szaporodását.

Az *Azotobacter vinelandii* savképzésével kapcsolatban számos irodalmi forrásmunka látott napvilágot. Így COHEN és JOHNSTONE [3] szerint a sav-

1. táblázat

**Az *Azotobacter vinelandii* szaporodása különböző tenyésztési feltételek között.
A sejtsűrűség mérve 630 mμ-nál**

(1) Az alkalmazott táptalaj sorszáma	(2) Nefelométer állása a fejlődés folyamán								
	(3) Rázott tenyészet/óra				(4) Álló tenyészet/nap				
	18	20	22	42	5	11	15	18	21
I	0,10	0,10	0,10	0,35	0,22	0,42	0,60	0,95	1,14
II	0,11	0,16	0,24	1,26	0,21	0,42	0,60	0,84	0,98
III	0,73	1,27	1,85	—	0,24	1,90	2,80	2,96	3,32
IV	0,33	0,66	0,79	1,75	0,24	1,60	2,40	2,96	2,86

produkción bőséges nyálkatermelés kíséri. A szerzők szerint a savtermelés az *azotobakter* meghatározott törzseinél normális jelenség, míg DILWORTH [4] ezzel ellentétben azt állítja, hogy nem kielégítő növekedési feltételek eredménye, azaz a molekuláris oxigén magas parciális nyomása váltja ki.

A kísérlet eredményei azt bizonyítják, hogy a növekedés normális feltételei az álló tenyészetnél jóval inkább biztosítva voltak, mint a rázatott kultúránál. Az előbbi esetben a tápoldat elsavanyodása, valamint az intenzív nyálkaképzés elmaradt, s a megkötött nitrogén mennyisége párhuzamban volt a növekedés intenzitásával. A biomasza mennyisége ugyancsak az álló tenyészetnél volt a legtöbb. Az álló és a rázatott kultúra nitrogénkötésének adatait a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

Az *Azotobacter vinelandii* által megkötött nitrogén mennyisége álló és rázatott tenyészetben

(1) A tenyésztés körülményei	(2) A megkötött nitrogén mennyisége mg/100 ml tápoldat			
	I	II	III	IV
	tápoldat			
a) Rázott tenyészet	9,24	7,02	—	10,33
b) Álló tenyészet	17,92	—	25,06	21,24

A táblázat adataiból látható, hogy a kísérletbe vont *Azotobacter vinelandii*, törzs a III. táptalajban köt meg legtöbb nitrogént.

A továbbiak során az képezte feladatunkat, hogy a rázatott és álló tenyészet sejtjeit szétrocsoljuk, homogenizáljuk s összehasonlítsuk azok nitrogénkötő képességét. E célból a sejteket 6000/perc fordulatszámú centrifugálással választottuk el a tenyészfolyadéktól. Ezután a sejteket pH 8-ra beállított foszfátpufferban újból szuszpendáltunk, majd a szuszpenziót befagyasztottuk s présel szétrocsoltuk, majd 15 000/perc fordulatszám mellett 40°-on centrifugáltuk. Az így nyert szupernatant használtuk fel sejtnélküli ferment készítményként a nitrogénkötés tanulmányozása céljából. A vizsgálatokat Tunberg-féle kémcsövekben állítottuk be, ahova 1—3 ml sejtnélküli kivonatot, 1—3 ml üledékfeletti tenyészfolyadékot amelyet az első centrifugálásakor

nyertünk, valamint 80 μM -os KH_2PO_4 et adagoltunk. A szubsztrátum pH-ja neutrális volt. A fentiekén kívül a Tunberg kémcső oldaledényébe az ATP illetve az ADP nátriumsójának oldatát adagoltuk olyan mennyiségben, hogy a koncentrációjuk a csövekbe bevitt folyadék végtérfogatóra számítva 5 μM -os legyen. A továbbiakban még az „A” koenzim 2 mg-ját, valamint a nátrium-piruvát oldatát adagoltuk olyan mennyiségben, hogy ez utóbbinak a koncentrációja a reakció közegben 50 μM -os legyen. A kémcsövekbe 0,1 mg molibdén és 2,1 μg kobaltot vittünk be. Az oldaledények tartalmát közvetlen a kísérlet megindulásakor egyesítettük a kémcsövekben levő anyagmennyiséggel s így az azokban levő folyadék térfogata összesen 4,3 ml-t tett ki. A Tunberg csövekből a folyadék felszínéről kiszivattyúztuk a levegőt és a vakuumteret oxigén és nitrogén 1 : 9 arányú keverékével töltöttük meg, míg a kontroll edényekben argon képezte a gázatmoszférát. A kísérlet időtartama alatt a Tunberg csövekben levő folyadékot rázatással állandó mozgásban tartottuk. Az inkubáció 30 °C-on történt, melynek folyamán a megkötött nitrogén mennyiségét 2 óránként BULEN és munkatársai [1] által módosított ammónium-diffúziós módszerrel határoztuk meg, míg a fehérjék mennyiségét Tour módszerével mutattuk ki. A kísérlet eredményei a 3. táblázatban kerülnek bemutatásra.

Eredmények megvitatása

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a sejtnélküli kivonatok közel azonos aktivitást mutattak, mint azok a tenyészetek, amelyekből előállították az extraktumokat. Az állókultúrák tenyészetek kivonatai közel 2–3-szor több nitrogént kötöttek meg, mint a rázatott kultúrák. Az utóbbiaknál egyes esetekben nitrogénkötő képesség egyáltalán nem volt megállapítható. Kielemezhető a 3. táblázatból, hogy a szubsztrátum megfelelő serkentő anyagok adagolása nélkül nem volt képes nitrogént megkötöni. Különösen nagy energiájú foszfátok hozzáadása serkentette jelentősen a nitrogénkötő aktivitást a sejtkivonathoz (2,5 μg N/1 g fehérje). Feltételezhetően a sejtek szétroncsolása során az oxidáció és a foszforiláció összhangja a légzési láncban belül törést szenved s ennek következtében a nitrogénkötéshez feltétlenül szükséges ATP gerjesztés elégtelen lesz. Az energiában gazdag foszfátok hozzáadása fokozza az ATP szintézisét, sőt a Mg^{2+} egyedüli bevitel — amely a foszforilációs oxidáció aktivátora — serkenti ezt a folyamatot. Az ADP és a Mg^{2+} együttes hozzáadása a N-kötést jelentősen fokozza az egyedüli ADP-s kezeléshez viszonyítva.

Az energiában gazdag foszfát kötésekén kívül vizsgáltuk még a NAD, valamint a A-koenzim hatását az *Azotobacter vinelandii* extraktumának nitrogén fixáló képességére. Ezen anyagok ugyancsak lényeges mértékben serkentették a nitrogénkötés folyamatát. Feltételezhető, hogy ezeknek a vegyületeknek a serkentő hatása az elektron átviteli lánc aktiválásával van kapcsolatban. Ez kettős hatással lehet a nitrogénkötésre. Egyrésről az elektron ellátás aktivizálódik s ezek az elektronok vesznek részt a molekuláris nitrogén redukálásában, más részről pedig a légzés folyamán az elektron szállítás fokozódik, amely a foszforiláló oxidációt serkenti. Ezen vegyületek szinkron hatása a mitokondrium készítménnyel azonos, amelynek irodalmi áttekintését SZKULACSEV [8] adja a legrészletesebben.

Ugyancsak tanulmányoztuk a molibdén és a kobalt hatását az *Azoto-*

3. táblázat

Az *Azotobacter vinelandii* sejtnélküli szubsztrátumának nitrogénkötő aktivitása

(1) A tenyésztés feltételei	(2) A kísérlet száma	(3) A szubsz- trátum fehérje tartalma mg	(4) A kísérlet variánsai	(5) Az edény NH ₃ N tartalma a kísérlet végén mg	(6) A megkötött NH ₃ N mennyisége edény/μg	(7) 1 mg fehérjére eső N kötés μg
a) Rázógépen tenyésztett kultúrában	I	13,83	0	12,94	—0,18	—
			ATP	25,60	12,48	0,90
	II	12,00	ATP + MgCl ₂	24,75	11,63	0,84
			0	64,82	0,50	0
			ADP + MgCl ₂	61,98	—2,34	0
b) Álló kultúrában	I	17,33	0	75,56	—1,41	0
			ATP	102,83	25,80	1,48
			ATP	100,43	23,45	1,34
			MgCl ₂	85,31	8,33	0,48
			ADP + MaCl ₂	108,62	31,64	1,82
			ADP + MgCl ₂ + + CoSO ₄ · 7H ₂ O	100,09	23,11	1,33
			ADP + MgCl ₂ + + Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	91,37	14,39	0,83
			Piruvát + NAD	107,80	30,87	1,77
	II	17,33	ATP	121,81	44,33	2,58
			ATP + piruvát + NAD	135,73	48,75	2,81
			A-koenzim	98,49	21,51	1,24
			Piruvát + NAD + KoA	104,86	27,88	1,61

bacter vinelandii sejtnélküli kivonatára. Korábbi kísérleteinek alapján azt feltételeztük, hogy a molibdén a molekuláris nitrogén aktivációjában vesz részt. Amint a 3. táblázat adataiból látható, molibdén, ill. kobalt hozzáadása a szubsztrátumhoz ADP + Mg²⁺ jelenlétében antagonisztikus hatást gyakorolt a nitrogénkötésre. Lehetséges, hogy ez a gátló hatás a szabad és a foszforilációs oxidáció egymáshoz viszonyított arányának a szabad oxidáció irányába történő eltolódásával van kapcsolatban.

A különböző vegyületeknek az *Azotobacter vinelandii* nitrogénkötő képességére gyakorolt aktivizáló hatás mechanizmusát speciális vizsgálatokkal lehet megnyugtatóan tisztázni, amelyhez szükséges az ezt kísérő légzési folyamatok intenzitásának, valamint a redox potenciál értékének meghatározása. Csak a különböző anyagok hozzáadásával kiváltott ATP képződés növekedésének, vagy csökkenésének bizonyítása tekinthető objektív kritériumnak hatásuk értékelése szempontjából.

A fenti vizsgálatokat a Szovjetunió Tudományos Akadémiájának Mikrobiológiai Intézetében végeztük.

Összefoglalás

Az *Azotobacter vinelandii* sejtnélküli szubsztrátumának nitrogénkötő aktivitása szoros kapcsolatban van a tenyésztési feltételekkel.

Az erős aeráció gátolja az említett kultúra növekedését s ez csökkenti a sejtnélküli szubsztrátum nitrogénkötő aktivitását is.

Az álló kultúrából kapott sejtnélküli extraktum nitrogénkötő aktivitása hasonlóan magas, mint a tenyészeté.

A sejtnélküli szubsztrátumok nitrogénkötése külső serkentő rendszer hiányában is végbemegy kizárólag a saját foszforiláció hatására.

Irodalom

- [1] BULEN, W. A., BURNS, R. C. & LeCOMBE, J. R.: Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **53**, 532—539. 1965.
- [2] CARNAHAN, J. E. et al.: Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta*. **44**, 520—535. 1960.
- [3] COHEN, G. H. & JOHNSTONE, D. B.: Acid production by *Azotobacter vinelandii*. *Nature*. **198**, 211. 1963.
- [4] DILWORTH, M. J.: Oxygen inhibition in *Azotobacter vinelandii* pyruvate oxydation. *Biochim. Biophys. Acta*. **56**, 127—138. 1962.
- [5] FEDOROV, M. V.: *Rukovodstvo k praktičeszkim zanjatijam po mikrobiologii*. Szel'hozgiz. Moskva. 1951.
- [6] NICHOLAS, D. J. D. & FISHER, D. J.: Nitrogen fixation in extracts of *Azotobacter vinelandii*. *J. Sci. Food. Agric.* **11**, 603—608. 1960.
- [7] NICHOLAS, D. J. D. et al.: Some aspect of hydrogenase activity and nitrogen fixation in *Azotobacter* spp. and in *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.* **22**, 191—205. 1960.
- [8] SZKULACSEV, V. P.: Szootnosenie okiszlenija i foszforilirovanija v dühatel'noj cepi. Izd. A. N. SSSR. Moskva. 1962.

Érkezett: 1968. szeptember 18.

Data on the Nitrogen Fixing Activity of Cell-free Substrate Obtained from *Azotobacter Vinelandii* Culture

T. K. ILYINA

Dokuchaev Institute of Soil Science, Moscow (USSR)

Summary

The nitrogen fixing activity of the cell-free substrate of *Azotobacter vinelandii* is highly dependent on the conditions of cultivation.

Intense aeration inhibits the growth of the studied culture and this reduces the nitrogen fixing activity of the cell-free substrate.

The cell free extract obtained from a standing culture shows a similarly high activity as that of the culture.

In the absence of an external stimulating system, the nitrogen fixation of cell free substrates takes place also exclusively due to their own phosphorylation.

Table 1. Multiplication of *Azotobacter vinelandii* under differing culture conditions. Cell density measured at 630 μm . (1). The series number of the applied medium. (2) The height of the Nephelometer in the course of development. (3) Shaken culture/hour. (4) Standing culture/day.

Table 2. The quantity of fixed nitrogen in *Azotobacter vinelandii* in standing and shaken cultures. (1) Culture conditions: a) Shaken b) Standing culture. (2) Quantity of fixed nitrogen mg/100 ml liquid medium (I—IV).

Table 3. Nitrogen fixing activity of the cell free *Azotobacter vinelandii*. (1) Culture conditions: a) Shaken b) Standing culture. (2) Number of the experiment. (3) Protein content of the substrate mg. (4) Variants of the experiments. (5) The $\text{NH}_3\text{—N}$ content of the flask at the end of the experiment, mg. (6) The quantity of fixed $\text{NH}_3\text{—N}$ of the flask/g. (7) Fixed N/lmg protein.

Beiträge zur Stickstoffbindungsaktivität des zellfreien Substrates von *Azotobacter vinelandii*

T. K. ILJINA

„Dokutschajew“ Institut für Bodenkunde, Moskau (UdSSR)

Zusammenfassung

Die Stickstoffbindungsaktivität des zellfreien Substrates von *Azotobacter vinelandii* steht in einem engen Zusammenhang mit den Züchtungsbedingungen.

Starke Aeration hemmt das Wachstum der Kultur, und dies setzt wiederum die Stickstoffbindungsaktivität des zellfreien Substrates herab.

Die Stickstoffbindungsaktivität des aus Stehkulturen gewonnenen zellfreien Extraktes ist gerade so hoch, wie diejenige der Kultur. Die Stickstoffbindung der zellfreien Substrate vollzieht sich auch in Abwesenheit eines äusseren stimulierenden Systems, einzig durch die eigene Phosphorylierung hervorgerufen.

Tab. 1. Vermehrung des *Azotobacter vinelandii* unter verschiedenen Zuchtbedingungen. Zellendichte bei 630 m μ gemessen. (1) Nummer des Nährbodens; (2) Stand des Nephelometers im Laufe der Vermehrung; (3) Schüttelkultur/Stunde; (4) Stehkultur/Tag.

Tab. 2. Menge des durch *Azotobacter vinelandii* gebundenen Stickstoffes in Schüttel- und Stehkultur. (1) Verhältnisse der Züchtung: a) Schüttelkultur, b) Stehkultur; (2) Menge des gebundenen Stickstoffes, mg/100 ml Nährlösung (I.—IV.).

Tab. 3. Stickstoffbindungsaktivität des zellfreien Substrates von *Azotobacter vinelandii*. (1) Verhältnisse der Züchtung: a) Schüttelkultur, b) Stehkultur; (2) Nummer des Versuches; (3) Eiweissgehalt des Substrates, mg; (4) Varianten des Versuches; (5) NH₃-N-Gehalt des Gefässes am Ende des Versuches, mg; (6) Menge des gebundenen NH₃-N-es, Gefäss/ μ g; (7) auf 1 mg Eiweiss zufallende Stickstoffbindung, μ g.

Влияние условий культивирования *Azotobacter vinelandii* на азотофиксирующую активность бесклеточных систем этого микроорганизма

Т. К. ИЛЬИНА

Почвенный Институт им. Докучаева, Москва (С.С.С.Р.)

Резюме

Азотофиксирующая активность бесклеточных препаратов *Azotobacter vinelandii* находится в тесной зависимости от условий выращивания культур.

Усиленная аэрация подавляет рост и азотофиксирующую активность культуры, следствием чего является снижение азотофиксирующей активности бесклеточных препаратов. Из клеток *Azotobacter vinelandii* выращенных в покое, получены высоко активные бесклеточные препараты.

Фиксация азота этих препаратов может происходить в отсутствие экзогенной АТФ-генерирующей системы за счет собственных процессов фосфорилирования.

Табл. 1. Рост культуры *Azotobacter vinelandii* при различных условиях выращивания. Интенсивность роста в единицах оптической плотности при 630 м μ . (1) Среды, в которых выращивалась культура. (2) Показание нефелометра в процессе развития. (3) Культура, выращиваемая на качалке/час. (4) Культура, выращиваемая в стационарных условиях/сутки.

Табл. 2. Азотофиксирующая способность *Azotobacter vinelandii* при различных условиях выращивания. (1) Условия выращивания культуры: а) при взбалтывании на качалке, б) в неподвижном состоянии. (2) Количество фиксированного азота, мг на 100 мл среды (I—IV.).

Табл. 3. Азотофиксирующая активность бесклеточных препаратов из *Azotobacter vinelandii*. (1) Условия выращивания культуры, из которой получали бесклеточные препараты: а) на качалке, б) в покое. (2) Номера опытов. (3) Количество белка в бесклеточных препаратах в мг. (4) Варианты опытов по бесклеточной фиксации азота. (5) Количество N—NH₃ в реакционных колбах в конце опыта в мкг. (6) Количество молекулярного азота, фиксированного в виде NH₃ в реакционных колбах, мкг. (7) Количество малекулярного азота, фиксированного в виде NH₃ на 1 мг белка, мкг.